

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de Septiembre de 2001 (13.09.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/66794 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12Q 1/68,
C12P 19/34

Senda Sement, 11, E-46023 Valencia (ES). **ALBERTÍ SERRANO, Sebastián** [ES/ES]; Universidad de las Islas Baleares, Ctra. Valldemossa, KM. 7, 5, Ed. Son Lledo, E-07071 Palma de Mallor (ES). **ROSELLÓ PICORNELL, Josep, Antoni** [ES/ES]; Universidad de Valencia, Carrer L'antigua Senda Sement, 11, E-46023 Valencia (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00079

(74) Mandatario: **OJEDA GARCÍA, Pedro**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de Marzo de 2001 (02.03.2001)

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Idioma de publicación: español

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: MOLECULAR METHODS FOR DETECTING GUAR GUM ADDITIONS TO LOCUST BEAN GUM

(54) Título: MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ADICIONES DE GOMA DE GUAR AL GARROFÍN

(57) **Abstract:** The invention concerns methods for detecting guar gum alone or in mixtures of guar gum and locust bean gum. The invention also concerns methods for extracting, amplifying and detecting DNA of guar and locust bean gums and the mixtures thereof. DNAs of plants from which guar and locust bean gums are extracted are amplified by means of polymerase chain reaction (PCR) using conserved initiators. Differences in the sequences of the amplification products obtained from these two plants enable their differentiation, the identification of guar DNA in mixtures of guar and locust bean mixtures and the design of guar-specific PCR initiators which detect guar only in mixtures of guar and locust bean gums.

(57) **Resumen:** Esta invención describe los métodos para detectar la goma de guar, sola o en mezclas de goma de guar con goma de garrofín. Describe los métodos para la extracción, amplificación, y detección del DNA de las gomas de guar y garrofín y de sus mezclas. El DNA de las plantas de las que se extraen las gomas de guar y garrofín se amplifican mediante la cadena en reacción de la polimerasa (PCR) usando unos iniciadores conservados. Las diferencias en las secuencias de los productos de amplificación obtenidos a partir de esas dos plantas permiten su diferenciación, la identificación de DNA de guar en mezclas de gomas de guar y garrofín, y el diseño de iniciadores de la PCR específicos del guar que lo detectan sólo en mezclas de gomas de guar y garrofín.

WO 01/66794 A1

Título**MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ADICIONES DE GOMA DE GUAR AL GARROFÍN****5 Sector de la técnica**

El garrofín o goma de algarroba, extraído de las semillas del algarrobo (*Ceratonia siliqua*), y la goma de guar, extraída de las semillas de la planta de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) se usan como aditivos alimentarios. Se utilizan fundamentalmente como espesantes, gelificantes, o estabilizantes en la industria alimentaria. Tal como se describe en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 9 de Diciembre de 1998, páginas L334/11 a L334/13, el garrofín tiene el número de código E 410 y la goma de guar tiene el E 412, y en esta patente usaremos esos códigos como sinónimos de las correspondientes gomas. Como aditivos alimentarios E 410 y E 412 se utilizan individualmente o juntos, o incluso en combinación con otros aditivos como los carragenatos (E 407), xantana (E 415), y pectina (E 440i). La adición de esos agentes confiere a los alimentos una serie de efectos como el espesamiento, suavidad, textura, etc. Algunos ejemplos de estas adiciones y de los efectos que provocan son: el aumento del tiempo de fusión en helados, la reducción en la pérdida de sólidos y aceleración en el cuajado durante la fabricación de quesos untados, y favorecer la unión entre las diferentes carnes que forman parte de salchichas, el salami y otros embutidos. Además, dependiendo del tipo de alimento y del aditivo, se añaden E 410 ó E 412, o ambos, dentro de límites máximos permitidos de entre el 0,15 y el 2 %, a alimentos como mermeladas, productos lácteos, cereales de desayuno, sopas deshidratadas, salsas, jarabes, etc.

25 Estado de la técnica

Tal como se describe en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11], E 410 y E 412 pueden diferenciarse mediante examen microscópico de sus soluciones acuosas teñidas con yodo y yoduro potásico. En esas preparaciones, el garrofín presenta células tubiformes alargadas, separadas o ligeramente interespaciadas. Sus contenidos de color marrón son más irregulares que los de la goma de guar. El E 412 muestra grupos de células redondeadas o piriformes cuyos

contenidos van del amarillo al marrón. Por lo tanto, teóricamente, estos métodos microscópicos deberían permitir la identificación de guar cuando estuviera formando partes de mezclas con el garrofín.

La goma de guar y el garrofín, individualmente o mezclados, se pueden utilizar como aditivos alimentarios, debiendo indicarse en la etiqueta de los alimentos la presencia de uno u otro aditivo, o la de ambos. Ambos aditivos son polisacáridos galactomananos, habiéndose descrito en la literatura diferencias en su composición química: relaciones galactosa:manosa de 1:4 y 1:2 para el garrofín y la goma de guar, respectivamente. Por lo tanto, E 410 y E 412 hidrolizados y derivatizados pueden diferenciarse fácilmente cuando están aislados mediante cromatografía de gases y cálculo de la relación galactosa:manosa en el cromatograma resultante. Sin embargo, dependiendo de su origen, suministrador, y lote, se han descrito variaciones en el grado de sustitución por galactosa de la cadena central de manosa de esos dos polisacáridos. Así por ejemplo, 37 % en E 412 y 23 % en E 410 [Cheetham, N. W. H., B. V. McCleary, G. Teng, F. Lum, and Maryanto. 1986. Gel-permeation studies on xanthan-galactomannan interactions. Carbohydr. Polym. 6:257-268.], relaciones galactosa:manosa para E 410 y E 412 de 1:2,69 y 1:1,44 [Angelini, E., C. Boniglia, M. Mosca, and G. Bellomonte. 1984. Detection and determination of plant gums by gas-chromatographic determination of their constituent monosaccharides. Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione. 13:479-484.], o de 3,01:1 y 1,48:1 [Preuss, A., and H. P. Thier. 1982. Quantitative analysis of natural thickeners and gums by methanolysis and capillary column gas chromatography. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 175:93-100.], respectivamente. Incluso se han descrito variaciones en los cocientes galactosa:manosa de entre 3,1:1 y 7,7:1 para fracciones del garrofín solubilizadas a temperaturas de entre 20 y 80 °C [Lopes da Silva, J. A., and M. P. Gonçalves. 1990. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with ethanol. Food Hydrocolloids. 4:277-287.]. Debido a esas variaciones de composición, en ciertas mezclas de gomas de guar y garrofín, puede ser técnicamente imposible asegurar los contenidos individuales de cada goma, y por las mismas razones puede ser técnicamente muy difícil el detectar adiciones de E 412 al E 410. De hecho se han documentado casos de adulteración de E 410 con E 412. El interés de este tipo de fraudes radica en los diferentes precios de ambos aditivos, siendo el E 412 más barato que el E 410.

Los polisacáridos de origen vegetal se usan frecuentemente como agentes estabilizantes en la industria alimentaria, y por lo tanto se han desarrollado una serie de métodos químicos y algunos físicos para identificar y cuantificar esos aditivos en mezclas y en alimentos. Ninguno de esos métodos, según la revisión de Morley y colegas [Morley, R. G., G. O. Phillips, and D. M. Power. 1972. Fractionation and identification of commercial hydrocolloid stabilising agents. *Analyst*. 97:315-319] ni el esquema de fraccionamiento secuencial propuesto y descrito en esa referencia pueden distinguir entre E 410 y E 412. Más recientemente, se han descrito aplicaciones de tipo electroforético, cromatografía de gases, y cromatografía gas-líquido, que se han usado para identificar y 10 cuantificar aditivos de tipo polisacárido, es decir del mismo tipo general que E 410 y E 412. Sin embargo, ninguno de esos métodos diferencian E 410 y E 412, además de que esos métodos sufren una serie de limitaciones, en particular cuando se aplican al análisis de alimentos, como son la necesidad de extracciones complejas de las muestras antes de su análisis y un equipamiento relativamente caro. Además, la hidrólisis de la muestra, un 15 primer paso necesario para el análisis cromatográfico de una mezcla de E 410 y E 412 liberaría también, por ejemplo, manosa a partir de la xantana, incrementándose por lo tanto el contenido de manosa y afectando a la relación galactosa:manosa del cromatograma. La xantana es otro aditivo alimentario (E 415) que se usa frecuentemente en combinación con E 410 y/o E 412.

20 En otro método diferente descrito, E 410, E 412, y otros polisacáridos usados como agentes espesantes, se aislaron, pirolizaron, y los productos de la pirolisis se analizaron mediante cromatografía de gases. Aunque mediante monitorización del tiempo de retención y de ciertos iones seleccionados se identificaron espesantes individuales, no se consiguió determinar de manera precisa el contenido en agentes espesantes presentes en 25 una mezcla compleja [Sjoeberg, A. M., and H. Pyysalo. 1985. Identification of food thickeners by monitoring of their pyrolytic products. *J. Chromatography*. 319:90-98.]. Se ha descrito un método usando la lectina extraída de *Bandeiraea simplicifolia* que permite la detección y cuantificación de goma de guar y garrofín en productos alimentarios comerciales [Patel, P. D., and G. B. Hawes. 1988. Estimation of food-grade 30 galactomannans by enzyme-linked lectin assay. *Food Hydrocolloids*. 2:107-118.]. Aunque este método detectó en los alimentos E 410 y E 412 y no otros aditivos de tipo

polisacárido usados comúnmente (xantana, carragenatos, alginatos, pectina), el método no pudo diferenciar entre la goma de guar y el garrofín.

Finalmente, se han descrito métodos basados en el DNA para la detección/identificación de plantas y productos derivados de plantas. Por ejemplo, la patente WO/9814607

5 describe un método para detectar una especie vegetal particular en un producto alimentario. El método se basa en la detección de secuencias específicas de plantas localizadas en el DNA cloroplástico. En esa patente se describen regiones del DNA cloroplástico que contienen secuencias características de determinadas plantas usadas como ejemplo, y que permiten la diferenciación entre naranjas y mandarinas. Aunque los

10 métodos descritos en esa patente pueden ser aplicables a la diferenciación de otras especies vegetales no descritas entre los ejemplos, los métodos no se aplicaron a la diferenciación del guar y el algarrobo ni de sus productos derivados E 412 y E 410, respectivamente. Por otra parte, se ha descrito que los estudios filogenéticos basados en el DNA cloroplástico no son a veces suficientemente resolutivos, es decir, que no permiten

15 decidir sobre la asignación de una muestra a una determinada especie vegetal [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden. 82:247-277.].

Igualmente, los árboles filogenéticos basados en las secuencias de DNA cloroplástico y

20 en otras líneas de evidencia (en otros caracteres) son a veces de difícil comparación porque producen resultados diferentes [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden. 82:247-277.]. Adicionalmente, no existen a día de hoy secuencias

25 cloroplásticas en las bases de datos públicas para el guar, por lo que su diferenciación del algarrobo y otras plantas basándose en esas secuencias requeriría primero su identificación, aislamiento y secuenciación. Finalmente, por las razones que se detallarán a continuación, la extracción de DNA, cloroplástico o no, de agentes espesantes, puede requerir métodos particulares no descritos en la patente citada en este párrafo.

30 Finalmente, para esta patente es relevante la descripción de un método basado en el DNA para la detección de la contaminación por trigo de 35 muestras de alimentos y aditivos alimentarios [Allmann, M., U. Candrian, C. Höfelein, and J. Lüthy. 1993. Polymerase

chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196:248-251.]. Este método está basado en la PCR y en el uso de iniciadores específicos del DNA ribosomal, es decir en secuencias del genoma del trigo que codifican para los componentes del RNA de los ribosomas de esa planta. Es de particular importancia para la presente patente el hacer notar que los autores del aludido método concluyen que los agentes o aditivos espesantes, y en concreto la goma de guar y el garrofín, no pueden ser utilizados como substratos para la extracción del DNA ya que los efectos de espesamiento y de absorción que provocan hacen imposible la extracción del DNA.

Descripción

- Breve descripción de la invención

15 Describimos la existencia de secuencias de DNA diagnósticas que permiten la identificación de las plantas de las que se extraen las gomas de guar y garrofín. Esas secuencias se han detectado también en las gomas de guar y garrofín, por lo tanto su detección en el DNA extraído de esas gomas permiten asegurar que su origen era el algarrobo o el guar.

20 Mediante PCR y los iniciadores conservados descritos en la Figura 1A, hemos amplificado dos regiones denominadas ITS1 e ITS2 a partir del DNA extraído de las semillas de *Ceratonia siliqua* y *Cyamopsis tetragonolobus*, es decir las plantas de las que se extraen respectivamente el garrofín (E 410) y la goma de guar (E 412). El análisis de los productos de amplificación mediante enzimas de restricción mostró patrones de restricción específicos de cada planta. La secuenciación de esos productos de 25 amplificación y la comparación de las secuencias alineadas mostró que ambas plantas pueden diferenciarse por la presencia de nucleótidos característicos de una u otra planta en determinadas posiciones de la secuencia. Además, el estudio en esas secuencias de nucleótidos compartidos por ambas plantas y otros específicos de cada una, mostró la presencia en la secuencia del DNA amplificado del guar de dos regiones que 30 denominamos PG21 (SEQ ID NO 5) y PG22 (SEQ ID NO 6) cuyas secuencias pueden usarse como iniciadores para la amplificación específica mediante PCR de una región dentro de la región ITS2 del guar. Las secuencias y posiciones de esos iniciadores

específicos del guar pueden observarse en las Figuras 1A y 3. Cuando los iniciadores PG21 y PG22 se usaron para amplificar DNA extraído no de semillas de las plantas, sino de las gomas de guar (E 412) y garrofín (E 410) concluimos que los métodos de extracción de DNA habituales, cuando se aplican a esas gomas, no permiten la amplificación de DNA mediante PCR. Por lo tanto, desarrollamos métodos alternativos de extracción de DNA a partir de esas gomas, que permitieron la amplificación del DNA. Usando los iniciadores PG21 y PG22, mediante PCR obtuvimos amplificación a partir del DNA extraído de todas las muestras conocidas de goma de guar y de ninguna muestra control de garrofín. Además, demostramos que con estos métodos de extracción y amplificación de DNA hemos podido detectar DNA del guar tanto en mezclas control de guar y garrofín como en algunas preparaciones comerciales etiquetadas como "garrofín" y que por lo tanto en teoría no deberían contener guar.

- Descripción detallada de la invención y ejemplos

15 En esta patente usaremos el término garrofín ó E 410 para designar el producto de moler los endospermos de las semillas del algarrobo o *Ceratonia siliqua* [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]. El término goma de guar ó E 412 se usará para designar el producto de moler los endospermos de las semillas de la planta de guar [European, C. 20 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]. Para una descripción más detallada de ambos términos, nos ajustamos a lo descrito en la referencia [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]. Aunque la presente invención no reivindica aspectos 25 taxonómicos, algunas de las secuencias descritas en ella y que son parte de las reivindicaciones pueden tener aplicaciones taxonómicas. Por lo tanto, las posiciones taxonómicas de las especies del algarrobo y el guar merecen más explicaciones. Por ejemplo, en la referencia [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.] 30 ambas especies se consideran pertenecientes a la familia *Leguminosae*, mientras que otras fuentes como la base de datos de taxonomía del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>) prefiere usar el nombre

de familia *Fabaceae*. Nosotros consideramos ambos nombres de familia como sinónimos, de acuerdo a lo considerado por el International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code, Koeltz Scientific Books, Alemania, 1994). Otro aspecto taxonómico se refiere al nombre científico de la planta de guar, que es citada como *Cyamopsis tetragonolobus* en 5 la referencia [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.] y como *Cyamopsis tetragonoloba* en la base de datos de taxonomía del NCBI. De nuevo, nosotros consideraremos aquí como sinónimos del guar los dos nombres de especie citados.

Los términos DNA, PCR, iniciadores, y secuencias, son inteligibles para los especialistas 10 en biología molecular. Sin embargo, requieren alguna puntualización por su utilización en español y en inglés. DNA se refiere al ácido desoxirribonucleico. PCR se refiere a la cadena en reacción de la polimerasa o "polymerase chain reaction", una reacción enzimática del DNA en la que dos iniciadores complementarios a dos regiones del DNA (uno para cada una de las dos hebras o cadenas del DNA) que se quiere amplificar se 15 añaden al DNA que se va a amplificar (DNA diana) en presencia de un exceso de nucleótidos a una polimerasa termoestable (polimerasa Taq). En una serie, generalmente 30, de ciclos de temperatura, el DNA diana se desnaturaliza, se une a los iniciadores, y se sintetiza una cadena hija a partir de cada iniciador. Las cadenas o hebras hijas, algunas veces denominadas amplicones, sirven como diana para sucesivos ciclos de amplificación 20 en los que los fragmentos de DNA que contienen secuencias reconocidas por los iniciadores se amplifican exponencialmente. Los iniciadores, también denominados a veces cebadores o "primers", se refieren a una cadena corta preexistente de nucleótidos a la cual la Taq polimerasa puede añadir nuevos desoxirribonucleótidos durante el proceso de PCR. Los iniciadores PG21 (SEQ ID NO 5) y PG22 (SEQ ID NO 6) han sido 25 producidos de manera sintética y son de suficiente longitud y tienen unas secuencias tales que se asegura que reconocen y se unen específicamente a zonas del DNA del guar dentro de las regiones denominadas ITS2 y no a las correspondientes al algarrobo. Por secuencias de DNA denominamos al orden relativo en el que las bases o nucleótidos (A, 30 C, T, G) se disponen en un determinado fragmento de DNA, un gen, un cromosoma o un genoma.

Las regiones conocidas como "internal transcribed spacer" o ITS son parte del denominado DNA ribosómico (rDNA) 18S-26S que a su vez codifica para el RNA

ribosomal (rRNA). Las ITS son regiones muy útiles para estudios filogenéticos de plantas [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden. 82:247-277.]. La organización de estas regiones del genoma se muestra en la Figura 1A y consiste en: dos regiones ITS denominadas ITS1 e ITS2 separadas por una región conservada denominada 5.8S y flanqueadas por las regiones denominadas 18S y 26S. Mientras que las ITS son muy variables en secuencia entre familias y géneros diferentes de plantas, las regiones 5.8S, 18S, y 26S tienen secuencias muy conservadas. El pequeño tamaño de las ITS (menos de 300 nucleótidos) y el hecho de estar flanqueados por secuencias conservadas facilitan su amplificación mediante PCR con iniciadores que reconocen secuencias conservadas de las regiones flanqueantes. Las regiones ITS y otras regiones componentes del rDNA están en múltiples copias en el genoma de las plantas, por lo que su aislamiento, detección, amplificación y secuenciación, es relativamente fácil incluso a partir de muestras antiguas como los herbarios. Se han descrito variaciones en longitud (número de nucleótidos) de las ITS, y aunque esas variaciones son limitadas, en algunas ocasiones han permitido diferenciar entre especies próximas. Pero, lo que es más relevante para esta invención, las diferencias de secuencia entre las ITS generalmente permite diferenciar entre especies de plantas pertenecientes al mismo género.

Esta invención describe los métodos para identificar la goma de guar, individual o en mezclas con el garrofín, mediante la amplificación de DNA y sus métodos de análisis. Para ello, usamos secuencias del rDNA, es decir secuencias de las regiones 18S, 5.8S, 26S, ITS1 e ITS2 descritas en la referencia [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden. 82:247-277.] y en la Figura 1A. Puesto que esas secuencias eran hasta el momento desconocidas para el algarrobo y el guar, los primeros experimentos de esta invención se dirigieron a determinar las secuencias de las regiones denominadas ITS1 e ITS2 del genoma de esas especies vegetales.

Con este fin, aislamos DNA de semillas del algarrobo y el guar, y lo amplificamos mediante PCR usando las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 (SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 4) e ITS3/ITS4 (SEQ ID NO 2/SEQ ID NO 3) descritos [White, T. J., T. Bruns, S. Lee,

and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego]. Esas parejas de iniciadores amplifican respectivamente las regiones ITS1 e ITS2 5 y parte de sus regiones adyacentes (ver Figura 1A). Los productos de amplificación se secuencian directamente o bien se detectaron por electroforesis en geles de agarosa, se aislaron y purificaron a partir de ellos, se clonaron y secuencian. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante programas de ordenador y se identificaron las regiones ITS1 e ITS2 y sus regiones adyacentes. La identificación se realizó mediante 10 comparación de las secuencias obtenidas con otras secuencias conocidas del rDNA de plantas. Los detalles experimentales y los correspondientes resultados se explican en el ejemplo I.

Los análisis de las secuencias obtenidas a partir de las semillas del guar y el algarrobo demostraron que tanto la región ITS1 como la ITS2 de ambas plantas difieren entre si en 15 la composición y secuencia. El análisis de dichas secuencias mediante digestión con endonucleasas o enzimas de restricción (restrictasas) puede realizarse mediante programas informáticos, como el programa MacVector (Oxford Molecular Group PLC), para así predecir los tamaños de los fragmentos que se generarian mediante el uso de cada restrictasa. Realizamos ese tipo de análisis informático (resultados no mostrados) y 20 seleccionamos algunas restrictasas para mostrar la utilidad de este tipo de análisis como método de diferenciación del DNA de ambas plantas. Con este fin, amplificamos separadamente las regiones ITS1 e ITS2 de ambas plantas a partir del DNA extraido de sus semillas, tal como se detalla en el ejemplo I. Los productos de amplificación se purificaron y digirieron con varias restrictasas que generan patrones de restricción 25 diferenciales para el guar y el algarrobo. Los resultados de este tipo de análisis, y los detalles experimentales correspondientes, se describen en el ejemplo II.

Las diferencias en las secuencias de DNA obtenidas a partir del DNA extraido de las semillas de guar y algarrobo sugirieron que podría diseñarse una metodología, basada en la PCR y en dichas secuencias, para la detección específica del guar. El estudio detallado 30 de las secuencias obtenidas para ambas plantas (mostrado en las Figuras 2 y 3) mostró zonas donde las diferencias de secuencia entre ambas plantas eran mayores. Así, como ejemplo no limitante de esta estrategia, elegimos dos regiones que denominamos PG21 y

PG22 en la Figura 3, para ser utilizados como iniciadores específicos del guar en experimentos de PCR. En esas dos regiones las secuencias de las dos plantas difieren en varios nucleótidos, particularmente en las regiones 3' de los iniciadores indicados. Es bien conocido en el campo de la PCR y de la biología molecular que las diferencias de secuencia en las zonas 3' de los iniciadores, más que en la zona 5', incrementan la especificidad de los iniciadores. Como se detalla en el ejemplo III, el DNA extraído de las semillas de guar amplificó con los iniciadores PG21/PG22, pero no se obtuvo amplificación a partir del DNA extraído del algarrobo. Estos resultados demostraron la especificidad de los iniciadores que habíamos diseñado.

Como hemos mencionado en otros apartados, la amplificación de DNA mediante PCR a partir de muestras vegetales y otras muestras ricas en polisacáridos no es siempre una tarea fácil, ya que los polisacáridos son buenos inhibidores de la mayoría de los enzimas utilizados en biología molecular, como las polimerasas, restrictasas, y ligasas [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*. 17:274-276.]. Esta es precisamente la situación en la que se encontrará cualquier investigador que pretenda poner a punto un método de detección basado en el DNA en muestras comerciales de goma de guar y garrofín, ya que, por definición [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.], estas muestras deben contener al menos un 75% de polisacárido (galactomanano). Puesto que se han descrito un gran número de métodos e incluso de kits comerciales para solventar los problemas causados por los polisacáridos a la hora de extraer y amplificar el DNA, probamos varios de esos métodos. Probamos primero el métodos basado en el CTAB [Doyle, J., and J. J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.] que habíamos usado con éxito aquí para extraer el DNA a partir de semillas (ver ejemplo I). También ensayamos un método de extracción basado en el SDS [Milligan, B. G. 1994. Plant DNA isolation., p. 59-98. In A. R. Hoelzel (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford.], un método basado en el etanol [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*. 17:274-276.], y los kits comerciales Nucleon PhytoPure Plant DNA extraction kit (Amersham Life Science) y DNeasy Plant

kit (Qiagen). Con ninguno de esos métodos obtuvimos amplificaciones a partir de muestras comerciales de goma de guar y garrofín, y de sus mezclas. Estos resultados negativos ya habían sido descritos antes por otros autores que no obtuvieron amplificaciones a partir de goma de guar y garrofín, mientras que en la mismas 5 condiciones experimentales obtenían amplificaciones a partir de otras muestras y alimentos de origen vegetal [Allmann, M., U. Candrian, C. Höfelein, and J. Lüthy. 1993. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196:248-251.]. Al referirse a los 10 resultados negativos obtenidos con la goma de guar y al garrofín, los mencionados autores dicen que "...los efectos de espesamiento y absorción hacen imposible la extracción..." del DNA. Puesto que ninguno de los métodos referidos antes produjeron resultados positivos, decidimos investigar y desarrollar nuestros propios métodos para la extracción de DNA a partir del garrofín y de la goma de guar.

15 Con este fin, ambas gomas individualmente en el rango del 0.1 a 10% en peso, o mezclas controladas de ellas, se resuspendieron en agua (método de extracción que denominaremos "agua"), o en soluciones tamponadas de diferentes composiciones y fuerza iónica (método del "Tris"), o en soluciones acetonitrilo de diferentes 20 composiciones (método del "acetonitrilo"), o en soluciones de etanol (método del "etanol"), a diferentes temperaturas entre 4 y 65 °C. Las mezclas así preparadas se agitaron entre 1 y 10 minutos y se centrifugaron. Los sobrenadantes de la centrifugación se recogieron y se utilizaron como material a amplificar en los experimentos de PCR, y además en ellos se cuantificaron el DNA y los polisacáridos. Sin embargo, en las 25 muestras procesadas según el método del etanol, se siguió el protocolo de la referencia [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. Biotechniques. 17:274-276.], y al final, el material disuelto se utilizó para PCR y cuantificación, igual que el resto de muestras obtenidos por los demás métodos. Para la PCR utilizamos los iniciadores PG21/PG22 y las condiciones descritas en el ejemplo III. Los resultados obtenidos con los diferentes 30 métodos de extracción se recogen en la Tabla 1 y se detallan en el ejemplo IV.

Como se explica en detalle en el ejemplo IV, aunque el método del agua extrae menos DNA que el método del Tris (que es el método que extrae más DNA a partir de las dos

gomas y de sus mezclas ensayadas), el método del agua es el más adecuado para extraer DNA de estas muestras para su posterior amplificación por PCR. Por estas razones, escogimos el método del agua para posteriores experimentos de PCR.

La utilidad de los métodos de extracción y amplificación de DNA a partir de la goma de 5 guar y garrofín, y de sus mezclas, que describimos en esta invención se comprobó mediante su ensayo en muestras controladas que contenían mezclas conocidas de goma de guar y garrofín, y también en muestras comerciales de garrofín. Para esos ensayos utilizamos el método de extracción del agua y de PCR con los iniciadores PG21/PG22. El análisis electroforético directo de los productos de amplificación o mediante restrictas 10 (ver ejemplo V para los detalles) demostró que: los métodos descritos en esta patente detectan la presencia de goma de guar en mezclas de garrofín y goma de guar. También demuestran que, de entre las preparaciones comerciales analizadas y etiquetadas como garrofín (o "locust bean gum"), algunas de ellas contenían goma de guar.

Los métodos descritos en esta patente se basan en la presencia de secuencias de DNA 15 diferenciales (o diagnósticas) que son específicas del guar y del algarrobo. Dada su especificidad, estos métodos basados en el DNA aseguran el cumplimiento con los requerimientos legislativos relativos a los aditivos alimentarios E 410 y E 412 en donde se dice que ambos son galactomananos extraídos de las semillas de las especies *Ceratonia siliqua* y *Cyamopsis tetragonolobus* respectivamente. En consecuencia, un resultado 20 adicional de la metodología que proponemos es que confirma la autenticidad de las goma de guar y garrofín que pueden obtenerse de los suministradores.

- Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra la organización de las regiones 18S a 26S del rDNA. Se muestran 25 las posiciones relativas de los iniciadores usados para la amplificación por PCR de las regiones ITS1 e ITS2, respectivamente las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 e ITS3/ITS4. También se muestran las posiciones de la pareja de iniciadores PG21/PG22 utilizados para la amplificación específica de una región dentro de la ITS2 del rDNA del guar. Las secuencias de los iniciadores ITS5, ITS2, ITS3, e ITS4, se han descrito en la referencia 30 [White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H.

Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego].

La Figura 1B muestra los resultados del análisis electroforético en geles de agarosa de los productos de amplificación por PCR del DNA extraído de las semillas de guar y algarrobo. Las muestras se amplificaron con las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 (calles del gel marcadas 1 y 2) o con los iniciadores ITS3/ITS4 (calles 3 y 4), y por lo tanto contienen respectivamente las regiones ITS1 e ITS2. Las muestras amplificadas a partir del algarrobo se pueden ver en las calles 1 y 3, y las de guar corresponden a las calles 2 y 4. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura. Las muestras se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes) y observación bajo luz ultravioleta.

La Figura 2 muestra la secuencia de los productos mostrados en las calles 1 y 2 de la Figura 1B, es decir de las regiones contenido ITS1 de guar y algarrobo. Los productos se secuencian usando los iniciadores ITS5 e ITS2 (encerrados en cajas en la figura). Los nombres (identificadores) de las secuencias corresponden a los que les fueron asignados por las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ. La secuencia con identificador AJ245575 (SEQ ID NO 8) corresponde al algarrobo, y la secuencia con identificador AJ245578 (SEQ ID NO 7) corresponde al guar. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MacVector, y los guiones corresponden a posiciones vacías en las secuencias y son introducidos automáticamente por el programa para mejorar los alineamientos, mientras que los asteriscos indican posiciones conservadas en las dos secuencias. La región ITS1 esta subrayada y se determinó mediante comparación de las secuencias mostradas con las secuencias publicadas de otras plantas angiospermas [Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Research. 24:2857-2876.].

La Figura 3 muestra la secuencia de los productos mostrados en las calles 3 y 4 de la Figura 1B, es decir de las regiones contenido ITS2 de guar y algarrobo. Los productos se secuencian usando los iniciadores ITS3 e ITS4 (encerrados en cajas en la figura). Los nombres (identificadores) de las secuencias corresponden a los que les fueron asignados por las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ. La secuencia con identificador AJ245576 (SEQ ID NO 10) corresponde al algarrobo, y la secuencia con identificador AJ245577

(SEQ ID NO 9) corresponde al guar. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MacVector, y los guiones corresponden a posiciones vacías en las secuencias y son introducidos automáticamente por el programa para mejorar los alineamientos, mientras que los asteriscos indican posiciones conservadas en las dos secuencias. La 5 región ITS2 esta subrayada y se determinó mediante comparación de las secuencias mostradas con las secuencias publicadas de otras plantas angiospermas [Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Research. 24:2857-2876.]. También se muestran las secuencias de los iniciadores PG21 y PG22 diseñados como parte de esta patente.

10 La Figura 4 muestra un ejemplo de análisis mediante restrictasas de las regiones conteniendo ITS1 extraídas y amplificadas a partir de semillas de algarrobo y de guar. La región conteniendo ITS1 se amplificó mediante PCR con los iniciadores ITS5/ITS2 y se digirió con los enzimas *BcmI*, *Clal*, y *HaeIII* (calles 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, respectivamente). Las calles impares corresponden a amplificaciones del algarrobo, mientras que las pares 15 provienen del guar. Los productos de restricción se detectaron como en la Figura 1B. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura.

15 La Figura 5 muestra un ejemplo de análisis mediante restrictasas de las regiones conteniendo ITS2 extraídas y amplificadas a partir de semillas de algarrobo y de guar. La 20 región conteniendo ITS2 se amplificó mediante PCR con los iniciadores ITS3/ITS4 y se digirió con los enzimas *SmaI*, *XhoI*, y *HaeIII* (calles 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, respectivamente). Las calles impares corresponden a amplificaciones del algarrobo, mientras que las pares provienen del guar. Los productos de restricción se detectaron como en la Figura 1B. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus 25 tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura.

La Figura 6 muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR con los iniciadores PG21/PG22 del DNA extraído de las semillas de guar (calles 1 a 3). El DNA extraído de las semillas de algarrobo también se intentó amplificar por PCR con las mismas condiciones e iniciadores que el DNA extraído del guar, pero no se 30 detectó amplificación (calles 4 a 7). Los productos de amplificación se detectaron como en la Figura 1B. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura.

La Figura 7 muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación mediante PCR del DNA extraído de la goma de guar y garrofín y mezclas de ambas gomas. El DNA se extrajo mediante el método del agua y se amplificó con los iniciadores PG21/PG22. Las calles 1 y 2 muestran los productos de amplificación de muestras 5 controles negativas y positivas, respectivamente DNA extraído de garrofín (calle 1) y goma de guar (calle 2). Las calles 3, 4, y 5, muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA extraído de mezclas de garrofín conteniendo un 30%, 20%, y 10% de guar, respectivamente. Las calles 6, 7, y 8, muestran las amplificaciones obtenidas a partir de mezclas de garrofín conteniendo goma de guar al 12%, 6%, y 2%, 10 respectivamente. Las mezclas fueron preparadas en el laboratorio a partir de las gomas analizadas: el garrofín utilizado para todas las mezclas fue el analizado en la calle 1, la goma de guar utilizada para las mezclas mostradas en las calles 3 a 5 fue el analizado en la calle 2, mientras que las mezclas analizadas en las calles 6 a 8 se prepararon con otra goma de guar diferente.

15 La Figura 8 muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos a partir de diversas muestras comerciales de garrofín adquiridas de diferentes suministradores, y etiquetadas como "garrofín" o "locust bean gum". El DNA se extrajo de las muestras con el método del agua y se amplificó por PCR con los iniciadores PG21/PG22. Las calles contienen los productos de amplificación de las muestras 20 comerciales (calles 1 a 5), del control negativo (garrofín, calle 6), y del control positivo (goma de guar, calle 7).

Figura 9. Análisis de los productos de amplificación de los productos analizados en la Figura 8 mediante las restrictasas *TaqI* (calles 2 a 4) y *Xhol* (calles 5 a 7). Las calles 2 y 5, 3 y 6, y 4 y 7, contienen respectivamente las restricciones de los productos analizados 25 en las calles 2, 5, y 7 de la Figura 8. La calle 1 muestra el producto sin digerir obtenido a partir del guar control (calle 7 de la Figura 8).

Ejemplo I

Amplificaciones y secuencias de las ITS1 e ITS2 del DNA extraído de las semillas del 30 guar y el garrofín

Las semillas de guar y algarrobo se escarificaron mecánicamente, fueron embebidas en agua estéril durante unas 16 horas, y luego germinadas sobre papel húmedo dentro de

placas de Petri. El DNA se extrajo a partir de 20 mg de tejido vegetal usando el protocolo del CTAB detallado en la referencia [Doyle, J., and J. J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.]. El contenido en DNA de las muestras se cuantificó en un fluorímetro usando los reactivos del PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit de Molecular Probes. Las regiones del rDNA que contienen las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron independientemente mediante PCR con las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 e ITS3/ITS4 respectivamente. Las secuencias de los iniciadores se pueden ver en la Figura 1A y están tomadas de la referencia [White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego]. Los parámetros de la reacción de PCR (35 ciclos) fueron de 90 segundos a 94 °C, 90 segundos a 56 °C, y 90 segundos a 72 °C, cada ciclo, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Las mezclas de reacción contenían: 250 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 1,25 unidades de Taq polimerasa, y 100 ng de DNA extraído de las semillas, todo ello ajustado a un volumen final de 50 µl con el tampón 1x de la DNA polimerasa suministrado por Pharmacia. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión, y se purificaron a partir de esos geles mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) o mediante Agarasa (Roche). El análisis por electroforesis en geles de agarosa se realizó en geles contenido 3% de agarosa en tampón 1xTAE y la detección se realizó mediante tinción con SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes) y observación bajo luz ultravioleta.

La Figura 1B muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA extraído de las semillas de algarrobo (calles impares) y de guar (calles pares). Las amplificaciones mostradas en las calles 1 y 2 se realizaron con los iniciadores ITS5/ITS2, y por lo tanto dan como resultado regiones del rDNA contenido ITS1. Las amplificaciones mostradas en las calles 3 y 4 se realizaron con los iniciadores ITS3/ITS4, y por lo tanto dan como resultado regiones del rDNA contenido ITS2. Los productos visualizados en la Figura 1B se secuenciaron con un secuenciador Automated Applied Biosystems DNA Sequencer usando el método del terminador fluorescente y los métodos recomendados por el fabricante. Los productos de

amplificación se secuenciaron directamente o se clonaron en el vector pGEM-T de Promega y luego se secuenciaron. En el segundo caso, para determinar la secuencia, se secuenciaron al menos 3 clones de cada producto de amplificación. Para la secuenciación se usaron los siguientes iniciadores mostrados en la Figura 1A: ITS5 e ITS2 para secuenciar los productos contenido la región ITS1 (calles 1 y 2 de la Figura 1B), y los iniciadores ITS 3 e ITS4 para secuenciar los productos contenido la región ITS2 (calles 3 y 4 de la Figura 1B).

Las Figuras 2 y 3 muestran las secuencias resultantes obtenidas y alineadas mediante el programa MacVector. Los identificadores o nombres de las secuencias corresponden a los números de acceso asignados por las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ. Las zonas adyacentes a ITS1 e ITS2 se determinaron por comparación de nuestras secuencias con las de otras plantas angiospermas [Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Research. 24:2857-2876.]. Como se muestra en las Figuras 2 y 3, existen varias posiciones en las secuencias alineadas en las que hay nucleótidos diferentes según que la secuencia corresponda al algarrobo o al guar. Además, las secuencias obtenidas a partir de las semillas de ambas plantas tienen diferente longitud, tanto para la región contenido ITS1 (la ITS1 del guar tiene 2 nucleótidos más que la correspondiente del algarrobo), como para la región contenido ITS2, que es 5 nucleótidos más larga en el algarrobo que en el guar. Esas diferencias de longitud serían por si mismas suficientes para discernir si los productos de amplificación provienen del guar o del algarrobo, utilizando métodos que son conocidos en el campo de la biología molecular.

Ejemplo II

25 Identificación del guar y el garrofín mediante amplificación de las ITS1 e ITS2 obtenidas a partir del DNA de sus semillas y restricción

La amplificación de las regiones contenido ITS1 e ITS2 a partir del DNA de las semillas de guar y algarrobo se obtuvo como en el ejemplo anterior. Los productos de amplificación se purificaron de los otros componentes de la reacción de PCR mediante el 30 High PureTM PCR Product Purification Kit de Boehringer. Las restricciones de los productos purificados se realizaron con los enzimas de restricción detallados en la Figuras 4 y 5 y en las condiciones recomendadas por los suministradores de las restrictas

(Boehringer, Pharmacia). Los productos de restricción resultantes se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 4% en 1xTAE, y se detectaron y visualizaron como en otros análisis electroforéticos anteriores.

La Figura 4 muestra los resultados de los análisis de restricción de las regiones 5 conteniendo ITS1 amplificadas a partir de las semillas de algarrobo (calles impares) y guar (calles pares). Las restricciones se realizaron con los enzimas *Bcl*I (calles 1 y 2), *Cla*I (calles 3 y 4), y *Hae*III (calles 5 y 6). Como puede observarse fácilmente en la figura, el DNA del guar en esta región puede diferenciarse del DNA de esta misma región del algarrobo mediante este tipo de análisis. Por ejemplo, *Bcl*I no corta en esta región del 10 DNA del algarrobo, mientras que en la misma región del guar el enzima genera dos fragmentos de 247 y 98 nucleótidos.

La Figura 5 muestra el mismo tipo de análisis mostrado en el párrafo anterior pero aplicado a los productos de amplificación que contienen las regiones ITS2. Como muestra esta figura, por ejemplo, el enzima *Sma*I genera dos fragmentos de 298 y 112 nucleótidos 15 en la región conteniendo ITS2 del algarrobo (calle 1), mientras que no corta en esa región del guar (calle 2).

Los ejemplos mostrados en las dos figuras anteriores no son limitantes, es decir que con la misma metodología pero usando otras restrictasas obtenibles comercialmente podrían obtenerse patrones de restricción diferentes a partir del DNA de las dos plantas 20 estudiadas. En este tipo de análisis, para predecir los fragmentos de restricción que se generarian según los diferentes enzimas, podemos ayudarnos de ensayos de restricción virtuales realizados con programas como MacVector u otros.

Ejemplo III

25 Diseño y utilización de iniciadores de la PCR específicos del DNA extraído de semillas de guar

El DNA extraído de semillas control de guar y algarrobo se extrajo mediante el método del CTAB como en el ejemplo I y se amplificó mediante los iniciadores PG21/PG22 utilizando las mismas condiciones que en el ejemplo I, excepto que la temperatura de 30 anillado fue de 55 °C. Los productos de amplificación se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en tampón 1xTAE, y se visualizaron mediante

tinción con bromuro de etidio o con SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes).

La Figura 6 muestra los resultados de este tipo de experimentos y demuestra que los iniciadores PG21 y PG22 amplifican específicamente el DNA extraído del guar y no del algarrobo. Los fragmentos de amplificación deberían tener una longitud de exactamente 194 nucleótidos, como se deduce de la secuencia AJ245577 entre los nucleótidos denominados PG21 y PG22 (ver Figura 3). Como puede observarse en la Figura 6, el producto amplificado a partir de los DNA extraído de diferentes semillas de guar se localiza en los geles de agarosa ligeramente por debajo del marcador de 200 nucleótidos, y por lo tanto su tamaño coincide con el esperado según la secuencia.

Ejemplo IV

Extracción de DNA de la goma de guar y garrofín y de sus mezclas

La extracción del DNA de la goma de guar y garrofín y de mezclas de ambas gomas se realizó como sigue. Se resuspendieron 10 mg de la goma, que se obtiene de los proveedores comerciales en forma de polvo, en 10 ml de agua (método del agua), o de una solución 10 mM de Tris-HCl pH 8,5 (método del Tris), o de una solución de agua y acetonitrilo en la proporción 7:3 (método del acetonitrilo), o en etanol al 35% (método del etanol). Las suspensiones se agitaron durante 5 minutos con un agitador de tubos de ensayo (vórtex) y se centrifugaron durante 1 minuto a 15.000 x g. Los sobrenadantes de la centrifugación se recogieron y usaron para posteriores experimentos de PCR y cuantificación, excepto en el caso de la muestra extraída por el método del etanol donde se siguió el protocolo detallado en la referencia [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. 25 Biotechniques. 17:274-276.], y el precipitado final se disolvió en 0,5 ml de agua. Para la cuantificación del DNA extraído siguiendo los cuatro métodos anteriores, se utilizaron 0,1 ml de los extractos y el PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit de Molecular Probes. Para la cuantificación de las hexosas totales se utilizaron 0,01 ml de los extractos y el método de cuantificación del fenol-sulfúrico [Keleti, G., and W. H. Lederer. 1974. Handbook of 30 Micromethods in the Biological Sciences. Van Nostrand Reinhold, New York.]. Para la amplificación por PCR, se utilizaron 0,005 ml de los extractos y los iniciadores

PG21/PG22 y las condiciones de PCR descritas en el ejemplo III. Los resultados obtenidos con los diferentes métodos de extracción se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

5 **Detección específica de la goma de guar, sola o en mezclas con garrofín, mediante PCR del DNA extraído de las gomas. Dependencia de la detección según el método de extracción del DNA.**

Gomas	Método de extracción	DNA ¹	Hexosas ²	DNA/polisacárido	PCR ³
Guar	H ₂ O	46.87	0.639	1 / 14,000	+
30% Guar ⁴	H ₂ O	8.6	0.523	1 / 60,000	+
10% Guar ⁴	H ₂ O	10.8	0.541	1 / 50,000	+
Garrofín	H ₂ O	14.22	0.572	1 / 40,000	-
Guar	Tris	77.3	1.056	1 / 14,000	+
30% Guar	Tris	156.1	0.361	1 / 2,500	-
10% Guar	Tris	232.5	0.494	1 / 2,000	-
Garrofín	Tris	509.7	0.721	1 / 1,500	-
Guar	Acetonitrilo	4.84	0.013	1 / 3,000	+
30% Guar	Acetonitrilo	1.72	0.019	1 / 11,000	-
10% Guar	Acetonitrilo	1.94	0.030	1 / 16,000	-
Garrofín	Acetonitrilo	1.72	0.029	1 / 17,000	-
Guar	Etanol	3.21	ND ⁵	NA ⁶	-
30% Guar	Etanol	0.3	ND	NA	-
10% Guar	Etanol	0.64	ND	NA	-
Garrofín	Etanol	0.86	ND	NA	-

1En ng/ml. Cuantificados mediante el PicoGreen^R dsDNA Quantitation Kit de Molecular Probes.

2En mg of polisacárido disuelto detectado (mediante el método del fenol-

10 sulfúrico) por mg de goma. 3Amplificación (+) o no amplificación (-) por PCR con los iniciadores PG21/PG22 y detección como en la Figura 1B. 4Porcentaje (en peso) de goma de guar en la mezcla goma de guar-garrofín. 5No detectado. 6No aplicable.

Como se muestra en la Tabla 1, los cuatro métodos de extracción ensayados tienen diferentes eficiencias de extracción de DNA a partir de la goma de guar y garrofín. Claramente, de los resultados obtenidos se concluye que el método del Tris es el más eficiente, seguido de los métodos del agua, del acetonitrilo, y del etanol. Las eficiencias en la extracción de DNA no siempre están relacionadas directamente con la cantidad de polisacárido disuelto, como puede deducirse de la columna de la Tabla que muestra las relaciones DNA/polisacárido obtenidas con cada método de extracción. Cuando se extraen gomas individuales (100% de goma de guar o garrofín), está claro que el método del Tris es mucho más eficiente que el resto de los métodos, y en particular extrae más eficientemente el DNA del garrofín que de la goma de guar. Esto último puede deducirse de los cocientes entre el DNA extraído por el método del Tris y por el método del agua. Estos cocientes son de 35,8 para el garrofín, y de sólo 1,6 para el guar.

Los resultados anteriores permiten entender los resultados que se obtuvieron cuando se extrajo DNA de mezclas de garrofín conteniendo un 30% ó un 10% de guar, y también los resultados obtenidos al amplificar por PCR los productos resultantes de las diferentes extracciones de DNA. Claramente, aunque el método del agua extrae menos DNA que el método del Tris, a partir de cualquier goma o de cualquier mezcla de ellas, el método del agua es el más adecuado para amplificar por PCR el DNA extraído de la goma de guar, del garrofín, y de sus mezclas. Esto se demuestra en la columna denominada "PCR" en la Tabla 1, donde se recogen los resultados obtenidos mediante amplificación por PCR con los iniciadores PG21/PG22. Como puede observarse en esa columna de la Tabla, aunque el método del Tris extrae más DNA que el método del agua a partir de mezclas de garrofín conteniendo 30% ó 10% de guar, sólo cuando esas mezclas se trajeron con el método del agua pudo obtenerse amplificación. Los resultados de estas extracciones y amplificaciones sugieren que la mayor parte del DNA extraído por el método del Tris a partir de mezclas de goma de guar y garrofín debe corresponder de hecho a DNA que proviene del garrofín, y que sin embargo con el método del agua debe extraerse suficiente DNA de la goma de guar contenido en la mezcla de gomas como para permitir su amplificación por PCR con los iniciadores PG21/PG22.

En resumen, los resultados obtenidos aconsejan utilizar el método de extracción del agua cuando se pretende detectar el guar presente en mezclas de goma de guar y garrofín mediante los métodos de PCR descritos aquí.

Ejemplo V**Detección específica del DNA de guar en gomas de guar y en mezclas de goma de guar y garrofín.**

En este ejemplo estudiamos mezclas de laboratorio de garrofín con diferentes contenidos en goma de guar y también muestras comerciales de garrofín. Los métodos utilizados son la extracción de las muestras con el método del agua descrito en el ejemplo anterior y la amplificación por PCR con los primers PG21/PG22 descrito en ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8.

La Figura 7 muestra los resultados del estudio de mezclas de laboratorio de garrofín 10 conteniendo 30%, 20%, y 10% de goma de guar. Esas tres muestras se hicieron utilizando las mismas dos muestras de goma de guar y garrofín. Pensando que quizás diferentes proveedores producen gomas de guar con diferentes contenidos en DNA, dependiendo de su proceso de fabricación u otras razones, también preparamos mezclas de garrofín con otra goma de guar distinta. Estas mezclas de garrofín contenían 12%, 6%, y 2% de goma 15 de guar. Como muestra la Figura 7, todas las mezclas de garrofín conteniendo goma de guar produjeron por PCR con los iniciadores PG21/PG22 un producto de amplificación del tamaño esperado para el guar, independientemente de la proporción de guar presente en la mezcla. Las muestras control conteniendo exclusivamente garrofín o goma de guar produjeron los resultados esperados: no amplificaron en el caso del garrofín, y 20 amplificaron en el caso de la goma de guar. Es interesante hacer notar que, confirmando nuestras sospechas, diferentes muestras comerciales de guar contienen diferentes cantidades de DNA. Este hecho puede deducirse si se comparan los resultados obtenidos en las amplificaciones de las mezclas de garrofín conteniendo goma de guar al 2% y al 10% (calle 8 y 5 de la Figura 7, respectivamente). Esas dos mezclas se obtuvieron 25 mezclando el mismo garrofín con goma de guar de dos proveedores distintos.

La utilidad de los métodos que acabamos de describir para detectar la goma de guar también se demostró en preparaciones comerciales etiquetadas como "garrofín" o su denominación en inglés "locust bean gum". Obtuvimos esas muestras comerciales de varios proveedores y seleccionamos algunas de ellas para su estudio por los métodos que 30 describimos aquí. En concreto, seleccionamos aquellas muestras que producían viscosidades por encima de 250 cps a temperatura ambiente, ya que el garrofín en esas condiciones suele producir viscosidades no mayores de 100 cps, y que por lo tanto podría

sospecharse que las altas viscosidades podrían provenir de la presencia inadvertida o no declarada de goma de guar. Como ilustra la Figura 8, cuatro de las cuatro muestras de, teóricamente, garrofín, produjeron amplificaciones por PCR con los iniciadores PG21/PG22 específicos del guar (calle 2 a 5 de esta Figura). Estos resultados demuestran 5 que las cuatro muestras mencionadas contienen goma de guar, aunque en diferentes proporciones, como puede deducirse de las diferentes intensidades de las bandas observadas en el gel (comparar por ejemplo las calles 2 y 3). Las gomas control de garrofín y guar produjeron los resultados esperados de no amplificación (calle 6) y amplificación (calle 7). Una muestra comercial etiquetada como "garrofín" pero que 10 producía los valores de viscosidad esperados para el garrofín, también produjo los resultados esperados de no amplificación por PCR.

Obtuvimos una evidencia adicional del contenido en guar en preparaciones comerciales etiquetadas como "garrofín" mediante restricción de los productos de amplificación mencionados en el párrafo anterior. Para diseñar y realizar este análisis seguimos las 15 direcciones y métodos utilizadas en el ejemplo II y la secuencia AJ245577 mostrada en la Figura 3. Como se muestra en la Figura 9, los productos de amplificación mostrados en la Figura 8 contienen dos puntos de restricción para la restrictasa *TaqI*, que genera tres fragmentos de 106, 52 y 36 nucleótidos. El mismo enzima generaría, según ensayos de restricción por ordenador, sólo dos fragmentos de restricción de 143 y 52 nucleótidos en 20 la región de amplificación equivalente del algarrobo, es decir en la secuencia comprendida entre los iniciadores PG21 y PG22. Adicionalmente, el enzima *XbaI*, que no corta en la secuencia del algarrobo, produce dos fragmentos en las muestras amplificadas, los mismos dos fragmentos que cabe esperar de la restricción con este enzima del DNA de guar entre los iniciadores PG21 y PG22. Por lo tanto, las restrictasas utilizadas en este 25 ejemplo son diagnósticas, pero también podrían serlo otros enzimas de restricción, tal como discutimos en el ejemplo II.

Reivindicaciones

1. Procedimientos para la diferenciación entre las semillas de las especies vegetales *Cyamopsis tetragónolobus* (o *Cyamopsis tetragonoloba*) y *Ceratonia siliqua* **caracterizados** porque se realizan a través de comprobar las diferencias del rDNA extraido a partir de las semillas de esas dos especies, mediante las siguientes operaciones:
 - 5 i) se germinan las semillas y se extraen los DNA de ellas,
 - ii) los DNA extraídos se amplifican por PCR mediante los iniciadores ITS2, ITS3, ITS4, e ITS5, que son específicos del rDNA, y que se utilizan combinados según las parejas ITS5/ITS2 e ITS3/ITS4, y
 - 10 iii) se detectan los rDNA productos de la amplificación.
2. Procedimientos para la detección de las diferencias en los rDNA amplificados a partir de las semillas por los procedimientos descritos según la reivindicación 1 **caracterizados** porque los rDNA productos de la amplificación se secuencian y se comparan con las secuencias del rDNA del guar y algarrobo descritas en esta patente, de manera que por su mayor o menor identidad con ellas puede deducirse si la secuencia obtenida a partir de una semilla incógnita corresponde al guar o al algarrobo. Dichas secuencias corresponden a las denominadas AJ245575 y AJ245576 en el caso del algarrobo, y AJ245577 y AJ245578 en el caso del guar.
- 15 20 25 30 3. Procedimientos para la detección de las diferencias en los rDNA amplificados a partir de las semillas por los procedimientos descritos según la reivindicación 1 **caracterizados** porque sin requerir la secuenciación, se aprovechan las diferencias en las secuencias descritas en la reivindicación 2 para identificar el rDNA amplificado como proveniente del guar o el algarrobo, y que consiste en que los rDNA productos de la amplificación se,
 - i) digieren con enzimas de restricción que producen fragmentos diferentes según la secuencia digerida, como por ejemplo, pero no exclusivamente, los enzimas *BcnI*, *Clal*, *HaeIII*, *XhoI* ó *SmaI*,

ii) los productos de la digestión se separan mediante, por ejemplo, electroforesis en geles de agarosa y se visualizan mediante tinción con SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes), bromuro de etidio u otro reactivo para la detección de DNA, y

5 iii) se comparan los productos de restricción visualizados en los geles con los obtenidos a partir de los controles de guar y algarrobo, de manera que la coincidencia con los patrones de restricción del rDNA amplificado a partir de una u otra planta permiten asignar el rDNA amplificado y digerido a partir de una semilla incógnita a una de las dos especies vegetales citadas.

10

4. Procedimientos para la detección específica de las semillas de guar, basados en diferencias en las secuencias del rDNA del guar y el algarrobo descritas en la reivindicación 2 **caracterizados** porque

15 i) se comparan las mencionadas secuencias mediante alineamiento de las mismas y se diseñan a partir de las secuencias de guar oligonucleótidos dirigidos contra ella, idénticos o similares a regiones de ella en las que hay diferencias con las secuencias equivalentes del algarrobo, como por ejemplo las secuencias PG21 y PG22 descritas en esta patente,

20 ii) dichos oligonucleótidos se utilizan como iniciadores para la amplificación por PCR del DNA extraído de las semillas de guar, de algarrobo o de semillas incógnitas que se sospecha puedan pertenecer a una de esas dos especies vegetales, y

iii) los DNA productos de la amplificación se detectan mediante cualquiera de los métodos descritos en las reivindicaciones 2 y 3.

25

5. Procedimientos para la detección de goma de guar (E 412) individualmente o mezclada con goma de garrofín (E 410) **caracterizados** porque se extrae el DNA de esas gomas o sus mezclas, se amplifica por PCR, y se detectan los productos de amplificación correspondientes al guar.

30

6. Procedimientos para la extracción del DNA de las gomas de guar ó E 412 y de garrofín ó E 412, y de sus mezclas, **caracterizados** porque

- 5 i) se pesa una cierta cantidad de esas gomas o sus mezclas y resuspende en un cierto volumen de, preferentemente, agua, o de una solución acuosa tamponada o no, conteniendo o no otros componentes como acetonitrilo o etanol,
- 10 ii) se agita durante un tiempo variable, preferentemente 5 minutos, a temperatura variable entre 0 °C y 100 °C, preferentemente a temperatura ambiente,
- iii) se separa el material soluble por decantación o preferiblemente por centrifugación, por ejemplo a 15.000 x g durante 1 minuto, y
- iv) se toma una muestra del material soluble, es decir la fase superior de la decantación o centrifugación, para su amplificación por PCR.

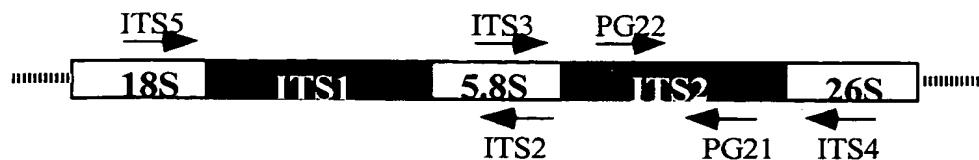
15 7. Procedimientos para la amplificación por PCR y detección de los productos de amplificación de los DNA extraídos de las gomas de guar y garrofín y de sus mezclas según los métodos de la reivindicación 6 y **caracterizados** porque se utilizan los métodos descritos en las reivindicaciones 2, 3, y 4.

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

1/9



ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS3: GCATCGATGAAAGAACGCAGC
ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC
PG21: TCCAAAACAAGATGGAGTCG
PG22: TGCCTGGCGTCGCGCGTC

Figura 1A

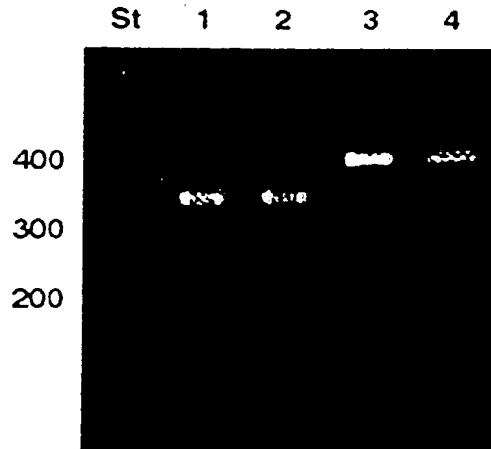


Figura 1B

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

2/9

ITS5

AJ245578	1	TGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT	50
AJ245575	1	TGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT	50
		*****	*****
5			
AJ245578	51	CATTGTCGATGCCTCACAAAGCAGTCCGACCCGTGAACTTGTTTGCTTAT	100
AJ245575	51	CATTGTCGATGCCTCACAAAACGAACGACCTGCGAATTGGTTAAACT-AT	99
		*****	*****
10	AJ245578	101 TTAGGGTTGGTTGGGGCGTGTCAAAACACGCCGACCTTCCCTTGGTTGG	150
	AJ245575	100 <u>CGGGGGCGGG</u> --GGCGTGCCTCCCAAGCTCCATGTCGGGAGGC	147
		***	***
15	AJ245578	151 GAGTTGTCTGCCTTGCCTGGCTTCTCTAGCCTTAACAAACCCACCGG	200
	AJ245575	148 <u>CTGTGGCCCCCGCC</u> ACTCGTGCACCTCGACCAAAAAACTAACCC-CTGG	196
		***	***
20	AJ245578	201 CGCTACACCGGCCAAGGAACTTAACTNNTCTGTGCGCCCTGCCAGCCC	250
	AJ245575	197 CGTTTAACCGGCCAAGGAACTACAACCAAGTGAGCGTGCTCCGATGACCT	246
		***	***
25	AJ245578	251 GGTAAACGGTGCTGTAGGTT-GNGTTTAGATACATGAATC-AAAATGAC	298
	AJ245575	247 GGTAAACGGCGATCGATCGATGAGCGTGTGACATTCTTATCCAAAATGAC	296
		*****	*****
30	AJ245578	299 TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCA	345
	AJ245575	297 TCTCGGTAACGGATATCTCGGCTCTCGATCGATGAAGAACGCAGCA	343
		*****	*****

ITS2

Figura 2

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

3/9

ITS3

5	AJ245577	1	TGCATCGATGAAGAACGCAGC	GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGA	50
	AJ245576	1	TGCATCGATGAAGAACGCAGC	GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGA	50
			*****	*****	*****
10	AJ245577	51	ATCCCGCGAACCTTCGAGTCTT	GAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTA	100
	AJ245576	51	ATCTTGTGAACCATCAAGTCTT	GAACACAAGTTGCGCCGAAGCCATCA	100
			***	***	***
	AJ245577	101	GGCCGAGGGCACGCC	TGCCTGGGCGTCGCGCGTC	149
	AJ245576	101	AGCCGAAGGCACGTCTGCCTGGG	TGTACACACTGTCGCCCGCACCCGT	150
			***	***	***
15	AJ245577	150	-ACGTCTCATTGGTGTGTTGAGTGG	-CGAATGTTGGCTTCCCACGAGC	197
	AJ245576	151	GGCCTCTCGCGTGGCTTC	GAGGAATGGGAGATTATGGCCTTCCGTGAGC	200
			***	***	***
20	AJ245577	198	GTTGCCTCATGGTGGTTGAAATT	TCGAGTCGGTGGAGGATGCCACGA	247
	AJ245576	201	TTCGCCTTATGGATGGCCAAAAG	AGAGTTCCGGTGGGACTGCCACGA	250
			***	***	***
					PG22
25	AJ245577	248	TTGATATGGTGGTTGAGTAATT	AGCTCGAGACCCATCGTGAGCGACTC-C	296
	AJ245576	251	C--GCACGGTGGATGAGCAAAGA	-CTCAAGACCACTCGTGCAAGTGT	297
			***	***	***
					PG21
30	AJ245577	297	ATCTTGTGTTGGACTCTTGACCC	---ACATGAGCATCTCCG-ATGCTC	341
	AJ245576	298	ACCCGGGATTGCGCTCGGAGAC	CCTTCAGCATCGCGAGGTGCATATGCCT	347
			***	***	***
					PG21
	AJ245577	342	GTTACGAGACCTCAGGT	CAGACGGGTTACCCGCTGAGTTAA	391
	AJ245576	348	CGAACGGGACCTAAGTCAGG	CGGGCTACTCGCTGAGTTAAAGCATATC	397
			***	***	***
35	AJ245577	392	AATAAGCGGAGGA	A	405
	AJ245576	398	AATAAGCGGAGGA		410
			*****	*****	*****
40					ITS4

Figura 3

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

4/9

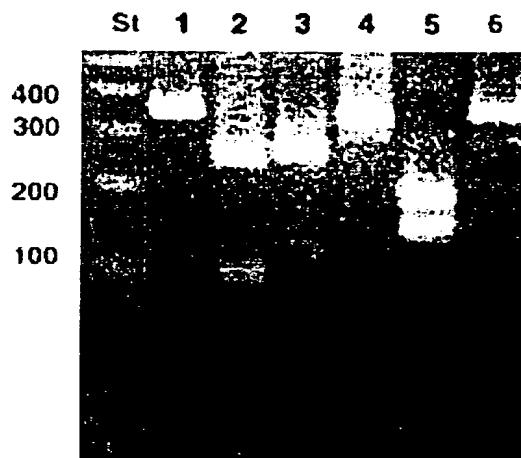


Figura 4

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

5/9

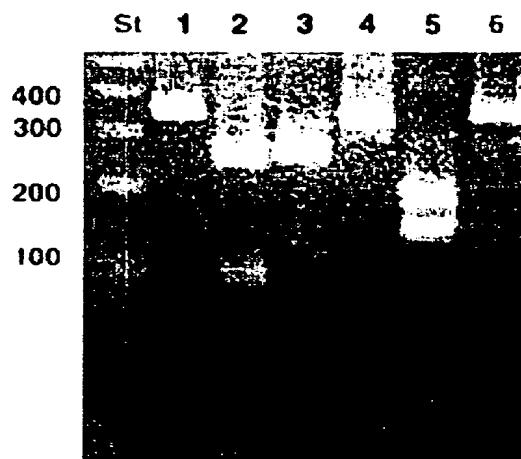


Figura 5

0/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

6/9

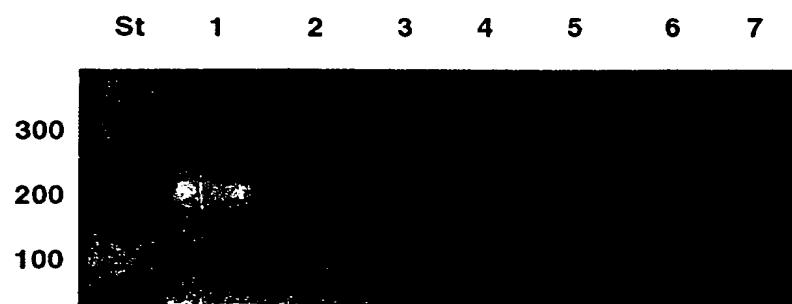


Figura 6

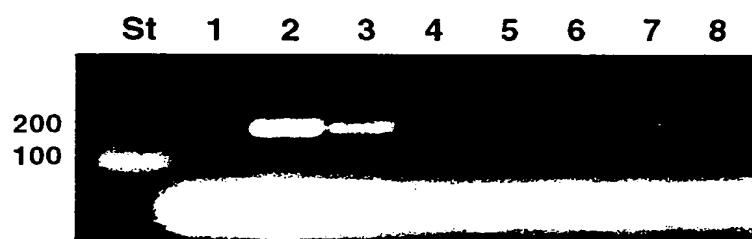


Figura 7

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

8/9

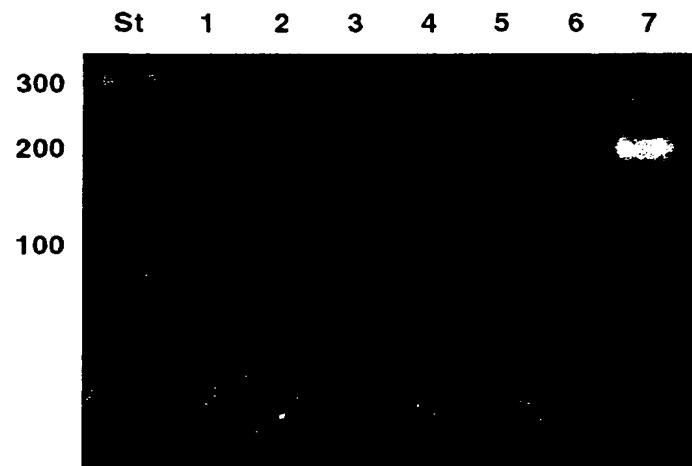


Figura 8

10/009980

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

9/9

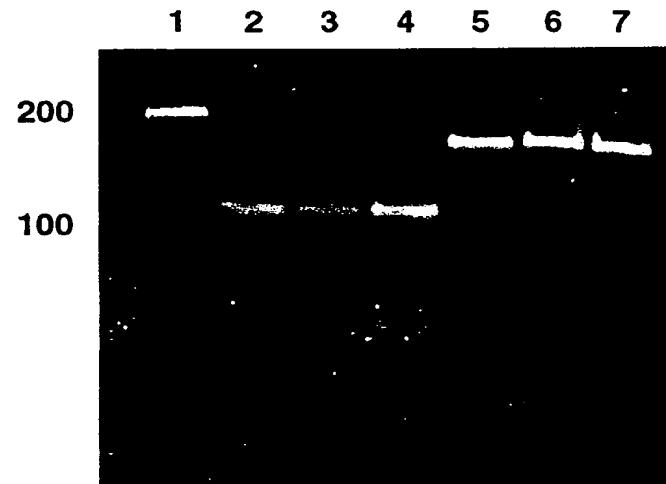


Figura 9

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> METODOS MOLECULARES PAA LA DETECCION DE ADICIONES DE
GOMA DE AL GARROFIN

<130> SOLICITUD DE PATENTE PCT/ES01/00079

10 <140> PCT/ES01/00079
<141> 2001-03-02

<150> ES200000560
<151> 2000-03-08

15 <160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo ITS5

<400> 1
30 ggaagtaaaa gtcgtaacaa gg 22

<210> 2
<211> 20
<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo ITS3

40 <400> 2
gcatcgatga agaacgcage 20

<210> 3
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo ITS4

<400> 3
tcctccgcattt attgatatgc 20

55 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo PG21

5 <400> 4
gctgcgttct tcatcgatgc 20

10 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo ITS2

<400> 5
tccaaaacaa gatggagtcg 20

20 <210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo PG22

<400> 6
tgccctggcg tcgcgcgtc 19

35 <210> 7
<211> 345
<212> ADN
<213> Cyamopsis tetragonoloba

40 <220>
<221> primer_bind
<222> Complement((2)..(23))

45 <220>
<221> primer_bind
<222> (325)..(344)

<400> 7
tggaaaggaga agtcgtaaca aggtttccgt aggtgaacct gcggaaggat cattgtcgat 60
gcctcacaag cagtcgcacc cgtgaacttg ttttgcttat ttagggttgg tttggggcgt 120
50 gtcaaaaacac gccgacccctc ctttgggtgg gagttgtctg ctttgcgtgg ctttctctta 180
gcctttaaca aaccaccggg cgctacacgc gccaaggaaa ctttaactntt ctgtgcgccc 240
ttgcccagccc ggtaacggtg ctgtgttagt tgnngtttaga tacatgaatc aaaatgactc 300
tcggcaacgg atatctcgcc tctcgcatcg atgaagaacg cagca 345

55 <210> 8
<211> 343
<212> ADN
<213> Ceratonia siliqua

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (2)..(23)
5
<220>
<221> primer_bind
<222> Complement((323)..(342))

10 <400> 8
tggaaaggaga agtcgtaaaca aggttttcgt aggtgaacct gtggaggat cattgtcgat 60
gcctcacaaa acgaacgacc tgcgaattgg ttaaactatc gggggcgggg ggcgtgcgtc 120
ctccccaaagcc tccatgtcgg gaggcgctg tggccccccg ccactcgatc tacctcgacc 180
aaaaaaactaa ccctggcggtt taacgcgcca aggaactaca accagtggac gtgctcccg 240
15 tggacctggta acggcgatcg atcgatgagc gtcgtgacat tcttatccaa aatgactctc 300
ggtaacggat atctcgatc tgcgtatcgat gaagaacgca gca 343

20 <210> 9
<211> 405
<212> ADN
<213> Cyamopsis tetragonoloba

25 <220>
<221> primer_bind
<222> Complement((2)..(21))

<220>
<221> primer_bind
30 <222> (385)..(404)

<400> 9
tgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacttgggtt gaattgcaga atcccgcgaa 60
35 ctttcgagtc ttgtacgcgca agttgcgccc gaagccatta ggccgagggc acgcctgcct 120
ggcgctcgcg cgtcgttgcc ctaactcgga cgtctcattt ggtgtcggtt agtggcgaaat 180
gttggcttcc cacgagcggtt gcctcatggt tggttgaaat tcgagtccgt gttggaggat 240
gcacgatcatatgggtt tgatgttgcgat gtcgagacc catcgatcgac gactccatct 300
40 tggggatccatctttttggac tctttgaccc acatgagcat ctccgtatcgatcgac gcttgcggatc 360
gacgggggtt cccgctgagt ttaagcatat caataagcgaggaa 405

45 <210> 10
<211> 410
<212> ADN
<213> Ceratonia siliqua

50 <220>
<221> primer_bind
<222> (2)..(23)

55 <400> 10
tgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacttgggtt gaattgcaga atcttggaa 60
ccatcaagtc ttgtacacaca agttgcgccc gaagccatca agccgaaggc acgtctgcct 120
gggtgtcaca cactgtcgcc cccaccccggt ggcctctcgatc gtggcttcga gaaatggc 180
gattatggcc ttccgtgaccc ttcgccttat qgatqgccccaaaqaaqagtt cccqatqgqc 240

```

4

actgccacga cgcacgggtgg atgagcaaag actcaagacc agtcgtgcaa gtgtcataacc 300
cgggattgcg ctcggagacc cttcagcattc gcgaggtgca tatgcctcga acgggaccct 360
aagtcaaggcg gggctactcg ctgagttaa gcatatcaat aagcggagga 410

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 01/00079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q 1/68 C12P 19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, WPI, CAPLUS, FROSTI, FSTA, BIOSIS, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WHITE, T., et al.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN PCR Protocols. A guide to methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego. 1990, pages 315-322 Cited in the application	1
P, X	BARKER N.P., et al.; "Generic relationships in the tribe Indigoferae (Leguminosae: Papilionoideae) based on sequence data and morphology"; junio 2000 EMBL/GenBank/DDBJ [in line]	2, 4-5
P, Y	[Retrieved of 2001-05-06] Retrieved from: EPO STRAND. access n° AF274687	3
A		7
Y	DLAUCHY, DENES et al., Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. 1999 Syst. Appl. Microbiol. 22 (3), 445-453	3
A		7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 June 2001 (07.06.01)

Date of mailing of the international search report

04 July 2001 (04.07.01)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 01/00079

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAWKINS, N.L Studies on the extractability, structural and physicochemical properties of oat gum/beta. glucan. 1994 Dissertation International Abstract , B. 55 (4) 1240	6-7
A	PANDEY, RAM NARESH et al., Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides 1996 Plan Mol. Biol. Rep. 14(1), 17-22.	6-7